

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000478

International filing date: 28 February 2005 (28.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0401997  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE LA DATE DE RECEPTION DU  
DOCUMENT DE PRIORITE OU DU NUMERO DE LA  
DEMANDE ANTERIEURE

(instruction administrative 323.a), b) et c) du PCT)

Expéditeur : L'OFFICE RECEPTEUR

Destinataire :

Demande internationale n° <b>PCT/FR2005/000478</b>
Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>(28/02/2005) 28 FÉVRIER 2005</b>

**Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes**

**1211 GENEVE 20  
SUISSE**

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>347602D21786</b>	Date d'expédition (jour/mois/année) <b>(20/07/2005) 20 JUILLET 2005</b>
Déposant <b>COMPAGNIE GERVAIS DANONE</b>	

1. ☐ L'office récepteur signale la réception du ou des documents de priorité indiqués ci-dessous le
2. ☒ L'office récepteur signale la réception d'une demande de préparation et de transmission au Bureau international du ou des documents de priorité indiqués ci-dessous le **28 Février 2005 (28/02/2005)**

## Identification du ou des documents de priorité :

<u>date de priorité</u>	<u>n° de la demande antérieure</u>	<u>pays ou office régional ou office récepteur du PCT</u>
<b>27 Février 2004 27/02/2004</b>	<b>0401997</b>	<b>Fr</b>

Nom et adresse postale de l'office récepteur  
**Institut National de la Propriété Industrielle  
97, boulevard Carnot - 59040 Lille Cedex**  
Télécopie : **03.28.36.34.81**

Affaire suivie par : **Véronique PLATEAU**

Téléphone : **03.28.36.34.13**





# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 JUL 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

☎ **INPI Indigo 0 825 83 85 87**

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

## REMISE DES PIÈCES

DATE

27 FEV 2004

LIEU

75 INPI PARIS 34 SP

N° D'ENREGISTREMENT

0401997

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

27 FEV. 2004

PAR L'INPI

## Vos références pour ce dossier

(facultatif) 241026 D21786 MTO

### NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE

## Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

## 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

## 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Concentrât liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire

## 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

## 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physiqueNom  
ou dénomination sociale

COMPAGNIE GERVAIS DANONE

Prénoms

Forme juridique

SOCIÉTÉ ANONYME

N° SIREN

552067092

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

126/130, rue Jules Guesde 92300 LEVALLOIS-PERRET FRANCE

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

**27 FEV 2004**

LIEU

**75 INPI PARIS 34 SP**

N° D'ENREGISTREMENT

**0401997**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 030103

**6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)**

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N° de pouvoir permanent et/ou  
de lien contractuel

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**241026 D21786MTO**

**Cabinet REGIMBEAU**

**20, rue de Chazelles**

**75847 PARIS CEDEX 17**

**01 44 29 35 00**

**01 44 29 35 99**

**info@regimbeau.fr**

**7 INVENTEUR (S)**

Les demandeurs et les inventeurs  
sont les mêmes personnes

**Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques**

☐ Oui

☒ Non : **Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)**

**8 RAPPORT DE RECHERCHE**

Établissement immédiat  
ou établissement différé

☒

☐

**Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)**

Paieement échelonné de la redevance  
(en deux versements)

**Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt**

☐ Oui

☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX  
DES REDEVANCES**

**Uniquement pour les personnes physiques**

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la  
décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): **AG** ☐

**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES  
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

☐ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

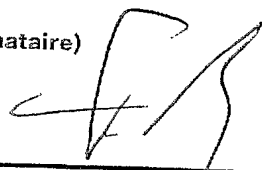
☐

La déclaration de conformité de la liste de  
séquences sur support papier avec le  
support électronique de données est jointe

☐

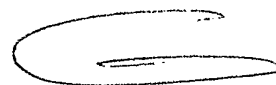
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,  
indiquez le nombre de pages jointes

**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE**  
(Nom et qualité du signataire)



92-1001

**VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI**



5           La présente invention concerne un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire. De manière préférentielle mais non limitative, les bactéries produites sont des bactéries lactiques.

          L'ingestion de certaines souches de bactéries, en particulier celles qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont particulièrement  
10   bénéfiques au niveau de la santé, notamment en favorisant un bon fonctionnement de la flore intestinale. En effet, ces bactéries produisent des bactériocines et de l'acide lactique qui augmentent la digestibilité des aliments, favorisent le péristaltisme intestinal, et accélèrent l'évacuation des selles. De plus, ces bactéries produisent  
15   certaines vitamines du complexe B, et favorisent en général l'absorption des vitamines et minéraux, diminuent le cholestérol sanguin, renforcent le système immunitaire et tapissent les muqueuses intestinales afin de protéger contre l'invasion et les activités des microorganismes nuisibles.

          De ce fait, depuis plusieurs années, les industries agroalimentaires tentent d'incorporer de telles bactéries dans leurs produits finaux, le plus généralement des  
20   yaourts.

          Actuellement, ces bactéries sont utilisées sous une forme congelée ou lyophilisée. Cependant, ces processus de production sont traumatisants pour les bactéries qui perdent une partie de leur activité et parfois leur viabilité. Cela est préjudiciable pour les industriels producteurs et pour les consommateurs de ces  
25   produits car les bactéries doivent satisfaire aux exigences de qualité et de performances technologiques, si possible pendant plusieurs mois. Il serait donc souhaitable d'utiliser des bactéries produites par un procédé leur assurant une viabilité et une activité maximale. A cet effet, une méthode consiste à produire les bactéries sous une forme liquide. Cependant il a été mis en évidence que cette méthode génère également une  
30   mortalité importante des bactéries, après l'introduction des bactéries dans le produit final.



En outre, pour diminuer les coûts de stockage des bactéries et faciliter l'adjonction des bactéries dans le produit final, il serait souhaitable de concentrer les bactéries sous forme liquide. Pour cela, l'homme du métier utilise de manière habituelle une étape de centrifugation ou de filtration. Cependant, la centrifugation est  
5 un processus traumatisant pour les bactéries qui peut entraîner une forte mortalité cellulaire notamment due à un fort cisaillement et de plus, ce procédé n'est pas bien adapté pour la centrifugation de faibles volumes tels que ceux requis dans la production de bactéries destinées à être additionnées en tant que probiotique à des produits alimentaires. Concernant une étape de filtration classique, celle-ci pose  
10 également des problèmes mortalité des bactéries et de colmatage des filtres par les bactéries.

Il serait donc souhaitable de produire un volume souhaité de concentrât liquide de bactéries qui présentent une activité et une viabilité maximale après l'étape de concentration et après l'introduction dans le produit final.

15 De manière surprenante et inattendue, les inventeurs ont montré qu'une étape d'adaptation des bactéries permettait d'augmenter de manière significative l'activité et la viabilité des bactéries après l'introduction dans le produit final.

De plus, les inventeurs ont montré qu'une étape de filtration tangentielle, sous certaines conditions particulières (pression, concentration, porosité de membrane etc),  
20 permettait de concentrer de gros volumes de culture de bactéries, tout en préservant leur viabilité et sans colmatage des filtres.

La filtration tangentielle permet de produire deux courants en fonction de la nature et de la structure de la membrane : le perméat (le milieu de culture sensiblement exempt de bactéries) et le retentât (contenant les bactéries, appelé aussi concentrât).  
25 Dans une filtration tangentielle, le fluide ne circule non pas perpendiculairement mais parallèlement à la surface de la membrane et assure ainsi par sa vitesse d'écoulement un auto nettoyage qui prévient l'accumulation de dépôts qui obturent la surface de filtration (appelé communément colmatage des filtres).

Un objet de la présente invention est donc un concentrât de bactéries caractérisé  
30 en ce que le concentrât est liquide et en ce que les bactéries sont adaptées, viables et à une concentration comprise entre  $5.10^{10}$  et  $5.10^{11}$  ufc/ml.

Par bactéries, on entend désigner préférentiellement selon la présente invention des bactéries lactiques, du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.* et en particulier *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*,  
5 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*.

Par bactéries adaptées, on entend désigner, selon la présente invention, des bactéries plus résistantes à différents stress, en particulier liés à différents stress physicochimiques.

10 Par bactéries adaptées et viables, on entend désigner, selon la présente invention, des bactéries dont le taux de survie après 28 jours dans un produit alimentaire, en particulier un produit laitier ou une boisson, est supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80%.

La viabilité des bactéries est mesurée par des techniques de numération connue de l'homme du métier comme par exemple la numération en masse, la numération en  
15 surface, les cellules de Malassez, le comptage direct, la turbidité, la néphélométrie, le comptage électronique, la cytométrie en flux, la fluorescence, l'impédimétrie, l'analyse d'images.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que les bactéries  
20 adaptées présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes quand elles sont ajoutées à un produit alimentaire :

- i) un taux de survie supérieur à 80% après 14 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7 ou
- 25 ii) un taux de survie supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80% après 28 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que les bactéries  
30 présentent les deux caractéristiques i) et ii).

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.

Selon la présente invention, les bactéries du concentrât sont viables pendant une période comprise entre 4 et 6 semaines.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes successives de propagation des bactéries dans un milieu de culture, d'adaptation des bactéries, de lavage du milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle, et de concentration en bactéries du milieu lavé par microfiltration tangentielle.

Selon la présente invention, le milieu de culture de l'étape de propagation est un milieu synthétique.

Par milieu synthétique, on entend désigner selon la présente invention un milieu dans lequel sont introduits des composants soumis à un contrôle quantitatif et qualitatif rigoureux.

Selon la présente invention, la solution utilisée à l'étape de lavage est adaptée à l'utilisation alimentaire du concentrât de bactéries et présente une pression climatique compatible avec la viabilité des bactéries.

Les inventeurs ont montré que l'étape d'adaptation des bactéries permet de réduire la mortalité des celles-ci, provoquée par le changement de milieu des bactéries entre leur milieu de culture et le produit alimentaire final à additiver.

Selon la présente invention l'adaptation des bactéries est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture des bactéries et/ou de paramètres des bactéries. Selon la présente invention, les paramètres du milieu de culture sont préférentiellement le pH, la pression osmotique et/ou la température.

D'autres paramètres du milieu de culture des bactéries pour la mise en évidence de l'adaptation des bactéries sont possibles, comme par exemple la concentration en sucre du milieu bactérien.

Préférentiellement, dans le cas où le paramètre du milieu de culture est le pH, l'étape d'adaptation est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.

Afin d'effectuer l'étape d'adaptation des bactéries au pH par acidification naturelle, on peut par exemple mesurer la concentration en sucre du milieu de fermentation et au-delà d'une concentration seuil pour chaque espèce de bactéries, on sait que le pH n'est plus régulé et l'adaptation au milieu devient très aisée.

Ainsi, par exemple, si la concentration en sucre du milieu de fermentation de *Lactobacillus casei* est de 9 g/L, le pH n'est plus régulé et est environ égal à 5. Il devient alors plus aisé pour la souche adaptée d'être ajoutée à un nouveau milieu et ceci permet une viabilité plus importante des bactéries dans le milieu final.

5 En outre, selon la présente invention, la filtration tangentielle peut être utilisée pour l'étape d'adaptation des bactéries.

Selon la présente invention la ou les membranes de filtration tangentielle sont d'une porosité comprise entre 0.01 et 0,5µm et de manière préférentielle, entre 0.1 et 0.3 µm.

10 Ces membranes sont utilisées pour les étapes de lavage et de concentration du procédé et éventuellement l'étape d'adaptation des bactéries.

Les membranes de filtration sont caractérisées par:

- la porosité et l'épaisseur de la couche filtrante dont dépend le débit de perméat.
- le diamètre des pores et leur répartition dont dépend l'efficacité de séparation.
- 15 - le matériau employé dont dépend la résistance mécanique, chimique, thermique et la facilité de nettoyage.

Par membrane de filtration, on entend désigner des membranes organiques ou minérales.

20 Les membranes organiques peuvent être composées entre autre d'acétate de cellulose, de polyamides aromatiques, de polysulfone, d'esters de cellulose, de cellulose, de nitrate de cellulose, de PVC, ou de Polypropylène.

Les membranes minérales peuvent être composées entre autre de céramique frittée, de métal fritté, de carbone, ou de verre.

Selon la présente invention, le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.

25 Préférentiellement, dans le cas où l'adaptation est mise en évidence par la taille des bactéries, la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.

La mesure de la taille des bactéries se fait par un moyen adapté.

30 Un moyen adapté peut être par exemple un prélèvement régulier de bactéries suivi d'une mesure de la taille des bactéries par cytométrie de flux.

Selon la présente invention, le pH du concentrât est compris entre 3 et 6.

Selon la présente invention, la température d'utilisation du concentrât est comprise entre 25 et 45°C et préférentiellement entre 35 et 39°C.

Par température d'utilisation, on entend désigner selon la présente invention la température du concentrât quand il est ajouté à un produit alimentaire.

5        Selon la présente invention, le concentrât est conditionné dans des poches souples, hermétiques et stériles.

Par poches souples hermétiques, on entend désigner, selon la présente invention et de manière préférentielle, des poches en plastique alimentaire.

10       Selon la présente invention, le concentrât, conditionné en poches souples hermétiques, peut être conservé à une température comprise entre -50°C et 4°C après conditionnement.

De manière optionnelle, il est possible de rajouter au concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples, et conservé à des températures basses, des molécules cryoprotectrices telles que le saccharose par  
15       exemple.

Selon la présente invention, le concentrât, conditionné en poches souples et hermétiques, conservé à une température comprise entre -50°C et 4°C, est réchauffé jusqu'à une température comprise entre 25°C et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C par un moyen adapté avant d'être utilisé.

20       Par moyen adapté, on entend désigner selon la présente invention par exemple l'utilisation d'un bain marie à une température non létale pour les bactéries, par exemple 37°C.

Un objet de la présente invention est également l'utilisation du concentrat liquide de bactéries adaptées et viables, selon la présente invention en tant qu'additif  
25       alimentaire.

Par additif alimentaire, on entend désigner selon la présente invention toute substance chimique ajoutée aux aliments durant leur préparation ou en vue de leur entreposage pour obtenir un effet technique désiré. De plus, selon la présente invention, le concentrât liquide de bactéries possède une numération stable, les  
30       bactéries étant viables et n'effectuant pas de fermentation dans le produit final additivé.

Un objet de la présente invention est également un produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la présente invention.

5 Selon la présente invention, le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.

Par produit laitier on entend désigner selon la présente invention, en plus du lait, les produits dérivés du lait, tels la crème, la crème glacée, le beurre, le fromage, le yogourt; les produits secondaires, comme le lactosérum, la caséine ainsi que divers aliments préparés contenant comme ingrédient principal du lait ou des constituants du  
10 lait.

Par boisson on entend désigner selon la présente invention des boissons comme par exemple les jus de fruits, les mélanges de lait et de jus de fruits, les jus végétaux tels que par exemple le jus de soja, le jus d'avoine ou le jus de riz, les boissons alcoolisées comme par exemple le kéfir, les sodas, et les eaux des source ou minérales  
15 additionnées ou non de sucre ou d'arômes par exemple.

Un objet de la présente invention est également un procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la présente invention, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et préférentiellement avant le  
20 conditionnement du produit alimentaire.

Selon la présente invention, le procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé est caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

25 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mesure de la viabilité et de l'adaptation des bactéries du concentrât liquide selon la présente invention.

Il va de soi, toutefois que ces exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne sauraient constituer en aucune manière une  
30 limitation.

Légende des figures :

Figure 1 : Suivi de la viabilité de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées dans un produit alimentaire de type yaourt sur une période de 28 jours.

5

Figure 2a : Histogramme de distribution de taille de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées avant d'être soumises à un stress acide.

Figure 2b : Histogramme de distribution de taille de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées après être soumises à un stress acide

10

#### EXEMPLES :

\* Exemple 1 : Conséquences de l'adaptation de souches de *L. casei* sur leur viabilité.

15

On souhaite évaluer les conséquences d'une étape d'adaptation de souches de *Lactobacillus casei* au niveau de leur viabilité.

Pour cela, on prépare un lot de bactéries témoin de *Lactobacillus casei* qui sont mises en culture dans un milieu MRS (milieu spécial permettant la croissance des lactobacilles, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

20

En parallèle à ce lot témoin, on prépare un lot de bactéries *Lactobacillus casei*, qui après la mise en culture dans un milieu MRS sont adaptées par une étape d'acidification naturelle.

Pour cela, après 17 heures de culture, une diminution du pH est réalisée par acidification naturelle sur une heure pour passer de pH 6,5 à pH 5.

25

Ensuite, les deux lots de bactéries sont lavés et concentrés en bactéries par microfiltration tangentielle.

Ces deux concentrats de bactéries sont introduit séparément dans une masse de yaourt à pH 5.5 et à une température de 10°C.

On mesure la quantité de bactéries vivantes à J+ 1 dans les deux lots de yaourt.

30

On prélève ensuite tous les jours un échantillon des deux lots de yaourt additionné respectivement du concentrat bactérien témoin et du concentrat de bactéries

adaptées, et on quantifie le nombre de souches survivantes par rapport au nombre de souches vivantes à J+1. Pour cela, on effectue une numération en masse.

Pour chacune des mesures de viabilité durant la période de conservation du produit fini, ce dernier est bien homogénéisé avant le prélèvement. Un prélèvement  
5 stérile de 1 ml de produit est réalisé. Une dilution sériée de 10 en 10 est effectuée. Les différentes dilutions du produit sont placées dans une boîte de Petri et un milieu gélosé liquide (puisque préalablement chauffé à 50°C) est coulé sur ces fractions du produit. On choisira le milieu à couler en fonction de la nature des bactéries que l'on souhaite compter. Le milieu gélosé durcit. Les boîtes de Petri sont alors placées en incubation  
10 pendant quelques jours (2-5j) à 37°C. Les résultats sont illustrés par la figure 1.

On observe qu'à au bout de 7 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 80% et pour le lot de bactéries adaptées de 105% (il y a eu une légère croissance bactérienne).

15 Au bout de 14 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 58% et pour le lot de bactéries adaptées de 110% (il y a eu une légère croissance bactérienne).

Au bout de 28 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 42% et pour le lot de bactéries adaptées de 110% (il y a eu une légère  
20 croissance bactérienne).

En conclusion, l'étape d'adaptation des bactéries induit une diminution de la mortalité des bactéries de l'ordre de 60 % par rapport à un lot témoin de bactéries non adaptées, après 28 jours dans un yaourt.

25

\* Exemple 2 : Evolution de la taille de bactéries adaptées et de bactéries non adaptées soumises à un stress acide.

On souhaite suivre l'évolution de la taille de bactéries adaptées et de bactéries  
30 non adaptées soumises à un stress acide.



Pour cela, on prépare un lot de bactéries témoin de *Lactobacillus casei* qui sont mises en culture dans un milieu MRS (milieu spécial permettant la croissance des lactobacilles, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

En parallèle à ce lot témoin, on prépare un lot de bactéries *Lactobacillus casei*,  
5 qui après la mise en culture dans un milieu MRS sont adaptées par une étape d'acidification naturelle.

Pour cela, après 17 heures de culture, une descente du pH est réalisée par acidification naturelle sur une heure pour passer de pH 6,5 à pH 5.

Ensuite, les deux lots de bactéries sont lavés et concentrés en bactéries par  
10 microfiltration tangentielle.

On effectue ensuite un prélèvement de bactéries et l'on mesure leur taille par cytométrie de flux. On établit ainsi un histogramme de distribution de taille des bactéries adaptées et non adaptées (lot témoin) (figure 2a). On observe que la distribution de taille des bactéries des deux lots est très similaire.

15 Ensuite, les deux lots de bactéries sont soumis à un stress acide par ajout des bactéries à un milieu ayant un pH de 3.

On effectue ensuite un prélèvement de bactéries et l'on mesure leur taille par cytométrie de flux. On établit ainsi un histogramme de distribution de taille des bactéries adaptées et non adaptées après un stress acide (figure 2b). On observe que la  
20 distribution de taille des bactéries des deux lots est très différente. Dans le lot de bactéries adaptées, la taille de fréquence la plus importante est de 3,2  $\mu\text{m}$  (fréquence de 0.016). Dans le lot de bactéries non adaptées, la taille de fréquence la plus importante est de 5.45  $\mu\text{m}$  (fréquence de 0.012).

En conclusion, l'étape d'adaptation des bactéries induit une diminution de la  
25 taille des bactéries de l'ordre de 60% lorsque celles-ci sont soumises à un stress acide, par rapport à des bactéries non adaptées. Il est donc possible de mettre en évidence l'adaptation des bactéries par la mesure de leur taille.

## Revendications

1. Concentrât de bactéries caractérisé en ce que le concentrât est liquide et en ce que les bactéries sont adaptées, viables et à une concentration comprise entre  $5.10^{10}$  et  $5.10^{11}$  ufc/ml.  
5
2. Concentrât selon la revendication 1 caractérisé en ce que les bactéries sont des bactéries lactiques, en particulier des bactéries du genre *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. *Streptococcus* spp. et *Lactococcus* spp.  
10
3. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries adaptées présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes quand elles sont ajoutées à un produit alimentaire :
  - i) un taux de survie supérieur à 80% après 14 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7 ou  
15
  - ii) un taux de survie supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80% après 28 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7.  
20
4. Concentrât selon la revendication 3 caractérisé en ce que les bactéries présentent les deux caractéristiques i) et ii).  
25
5. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 3 à 4 caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.
6. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries sont viables pendant une période comprise entre 4 et 6 semaines.  
30

### Revendications

1. Concentrât de bactéries caractérisé en ce que le concentrât est liquide et en ce que les bactéries sont adaptées, viables et à une concentration comprise entre  $5.10^{10}$  et  $5.10^{11}$  ufc/ml, lesdites bactéries adaptées étant plus résistantes à différents stress, en particulier liés à différents stress physicochimiques
2. Concentrât selon la revendication 1 caractérisé en ce que les bactéries sont des bactéries lactiques, en particulier des bactéries du genre *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. *Streptococcus* spp. et *Lactococcus* spp.
3. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries adaptées présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes quand elles sont ajoutées à un produit alimentaire :
  - i) un taux de survie supérieur à 80% après 14 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7 ou
  - ii) un taux de survie supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80% après 28 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7.
4. Concentrât selon la revendication 3 caractérisé en ce que les bactéries présentent les deux caractéristiques i) et ii).
5. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 3 à 4 caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.
6. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries sont viables pendant une période comprise entre 4 et 6 semaines.

7. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes successives de propagation des bactéries dans un milieu de culture, d'adaptation des bactéries, de lavage du milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle, et de concentration en bactéries du milieu lavé par microfiltration tangentielle.  
5
8. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'adaptation des bactéries est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture des bactéries et/ou de paramètres des bactéries.  
10
9. Concentrât selon la revendication 8, caractérisé en ce que les paramètres du milieu de culture sont le pH, la pression osmotique, et/ou la température.
10. Concentrât selon la revendication 9 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est le pH et que l'étape d'adaptation est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.  
15
11. Concentrât selon les revendications 1 à 10 caractérisé en ce que les bactéries sont adaptées par un procédé de microfiltration tangentielle.  
20
12. Concentrât selon la revendication 9, caractérisé en ce que le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.
13. Concentrât selon la revendication 12 caractérisé en ce que la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.  
25
14. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que son pH est compris entre 3 et 6.  
30

7. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes successives de propagation des bactéries dans un milieu de culture, d'adaptation des bactéries, de lavage du milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle, et de concentration en bactéries du milieu lavé par microfiltration tangentielle.  
5
8. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'adaptation des bactéries est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture des bactéries et/ou de paramètres des bactéries.  
10
9. Concentrât selon la revendication 8, caractérisé en ce que les paramètres du milieu de culture sont le pH, la pression osmotique, et/ou la température.
10. Concentrât selon la revendication 9 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est le pH et que l'étape d'adaptation est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.  
15
11. Concentrât selon les revendications 1 à 10 caractérisé en ce que les bactéries sont adaptées par un procédé de microfiltration tangentielle.  
20
12. Concentrât selon la revendication 9, caractérisé en ce que le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.
13. Concentrât selon la revendication 12 caractérisé en ce que la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.  
25
14. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que son pH est compris entre 3 et 6.  
30

15. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que sa température d'utilisation est comprise entre 25 et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C.
- 5 16. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est conditionné dans des poches souples, hermétiques et stériles.
17. Concentrât selon la revendication 16 caractérisé en ce qu'il est conservé à une température comprise entre -50°C à +4°C après conditionnement.
- 10 18. Concentrât selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il est réchauffé jusqu'à une température comprise entre 25 et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C par un moyen adapté avant d'être utilisé.
- 15 19. Utilisation du concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes en tant qu'additif alimentaire.
- 20 20. Produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.
21. Produit alimentaire additivé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un produit laitier et/ou d'une boisson.
- 25 22. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon l'une quelconque des revendications 20 à 21, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et avantageusement avant le conditionnement du produit alimentaire.
- 30 23. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

15. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il est conservé à une température comprise entre  $-50^{\circ}\text{C}$  à  $+4^{\circ}\text{C}$  après conditionnement.
- 5 16. Concentrât selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il est réchauffé jusqu'à une température comprise entre 25 et  $45^{\circ}\text{C}$ , avantageusement entre 35 et  $39^{\circ}\text{C}$  par un moyen adapté avant d'être utilisé.
- 10 17. Utilisation du concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 en tant qu'additif alimentaire.
18. Utilisation du concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, à une température comprise entre 25 et  $45^{\circ}\text{C}$ , avantageusement entre 35 et  $39^{\circ}\text{C}$ .
- 15 19. Récipient sous la forme de poches souples, hermétiques et stériles comprenant le concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.
- 20 20. Produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.
21. Produit alimentaire additivé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un produit laitier et/ou d'une boisson.
- 25 22. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon l'une quelconque des revendications 20 à 21, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et avantageusement avant le conditionnement du produit alimentaire.
- 30 23. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

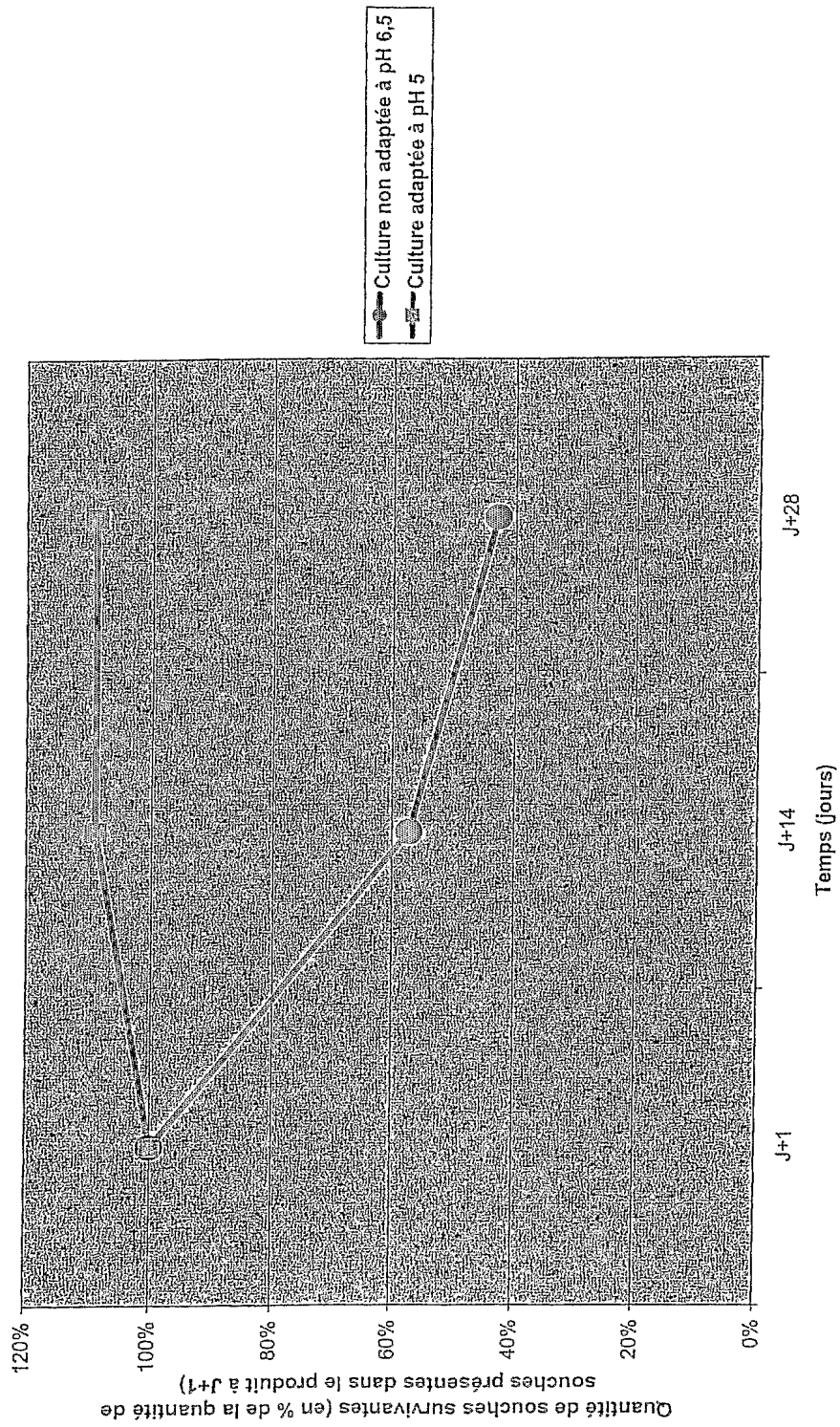


Figure 1



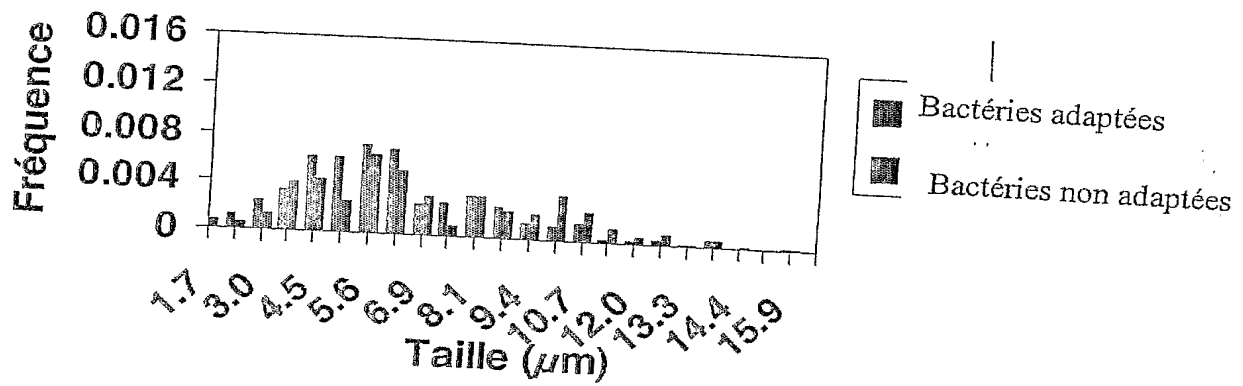


Figure 2a

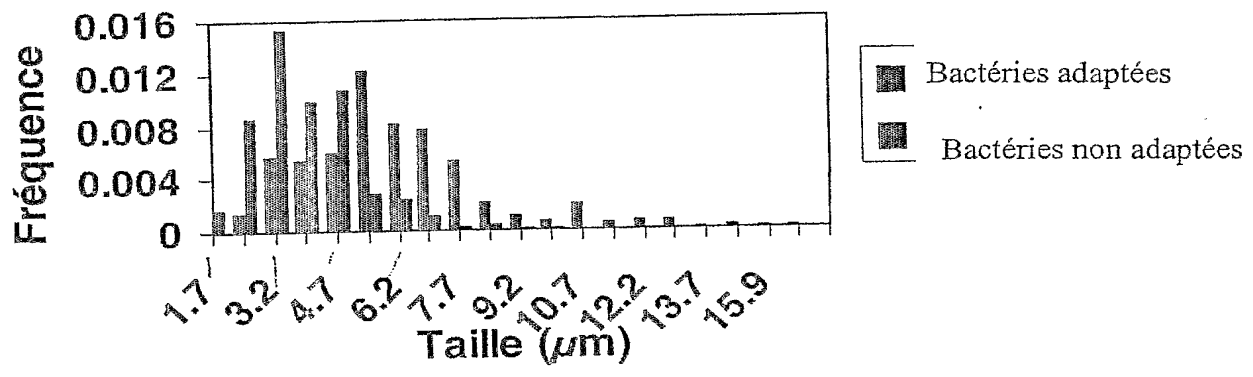


Figure 2b

reçue le 10/03/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235\*03

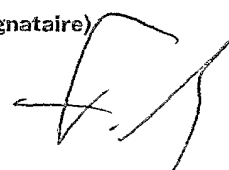
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1..2/...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103



Vos références pour ce dossier (facultatif)		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0401997
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Concentrat liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMPAGNIE GERVAIS DANONE : 126/130, rue Jules Guesde 92300 LEVALLOIS-PERRET FRANCE - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	
	Prénoms	TERRAGNO Luc
Adresse	Rue	16, boulevard de Clichy 75018 PARIS FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	
	Prénoms	CATONNET Guillaume
Adresse	Rue	34, rue Jean Rostand 91300 MASSY FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	REGULIER Pascal
Adresse	Rue	24 Chemin de l'aqueduc 78280 GUYANCOURT FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 92-1001		



## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



26 bis, rue de Saint Petersburg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

Indigo 0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65


DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2...2...



(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		241026 DRI 786 MTO
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		(040199/)
Concentrât liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMPAGNIE GERVAIS DANONE 126/130, rue Jules Guesde 92300 LEVALLOIS-PERRET FRANCE - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		DAVAL Christophe
Prénoms		
Adresse	Rue	12, avenue de la Division Leclerc 92320 CHATILLON FRANCE
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		TEISSIER Philippe
Prénoms		
Adresse	Rue	16 Bis, rue Suzanne 91300 MASSY FRANCE
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		BARBEAU Jean-Yves
Prénoms		
Adresse	Rue	43, avenue de la République 91430 IGNY FRANCE
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 92-1001		

